

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



[TRANSLATION]



**KOREAN INDUSTRIAL PROPERTY OFFICE**

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Industrial Property Office.

Application Number : 10-2000-0057208

Date of Application : September 29, 2000

Applicant(s) : Korea Advanced Institute of Science  
and Technology

September 7, 2001

COMMISSIONER (seal)



**【Document】** Patent Specification

**【Receiver】** Commissioner of Korean Industrial Property Office

**【Filing Date】** 2000. 09. 29

**【Title of the Invention】** DNA Chip Using Codon Scanning  
Algorithm

**【Applicant(s)】**

Name : Korea Advanced Institute of Science and  
Technology

I.D. No. : 3-1998-098866-1

**【Agent(s)】**

Name : Han-Young Lee  
I.D. No. : 9-1998-000375-1  
No. of General Power Registration: 1999-020229-3

**【Inventor(s)】**

Name : LEE, Sang Yup  
Nationality : Republic of Korea  
Address : 212-702 Expo Apartment, 464-1,  
Chonmin-dong, Yusong-gu, Taejon 305-390,  
Republic of Korea

Name : CHOI, Jong Gil  
Nationality : Republic of Korea  
Address : 4322 Korea Advanced Institute of Science  
and Technology, Kusong-dong, Yusong-gu,  
Taejon 305-701, Republic of Korea

**【Request for Examination】** Filed

**【Sequence Listings for Nucleotide & Amino Acids】**

**【 No. of Sequences 】** 014



【 Electronic File 】 Attached

【Purport】 This application is filed pursuant to Art. 42, while submitting the request for examination pursuant to Art. 60.

Agent: Han-Young Lee (seal)

【Attachment(s)】 1. Abstract, Specification(Drawing(s))





별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office.

출원번호 : 특허출원 2000년 제 57208 호  
Application Number PATENT-2000-0057208

출원년월일 : 2000년 09월 29일  
Date of Application SEP 29, 2000

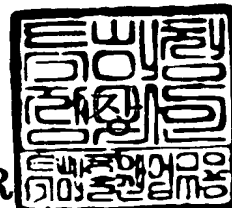
출원인 : 한국과학기술원  
Applicant(s) Korea Advanced Institute of Science and Technology



2001      년    09    월    07    일

특      허      청

COMMISSIONER





【서지사항】

|                    |   |
|--------------------|---|
| 【서류명】              | 특허출원서                                   |
| 【권리구분】             | 특허                                      |
| 【수신처】              | 특허청장                                    |
| 【제출일자】             | 2000.09.29                              |
| 【발명의 명칭】           | 코돈 검색 알고리즘을 이용한 DNA 칩                   |
| 【발명의 영문명칭】         | DNA Chip Using Codon Scanning Algorithm |
| 【출원인】              |   |
| 【명칭】               | 한국과학기술원                                 |
| 【출원인코드】            | 3-1998-098866-1                         |
| 【대리인】              |   |
| 【성명】               | 이한영                                     |
| 【대리인코드】            | 9-1998-000375-1                         |
| 【포괄위임등록번호】         | 1999-020229-3                           |
| 【발명자】              |   |
| 【성명의 국문표기】         | 이상엽                                     |
| 【성명의 영문표기】         | LEE, Sang Yup                           |
| 【주민등록번호】           | 640412-1025515                          |
| 【우편번호】             | 305-390                                 |
| 【주소】               | 대전광역시 유성구 전민동 464-1 엑스포아파트 212동 702호    |
| 【국적】               | KR                                      |
| 【발명자】              |   |
| 【성명의 국문표기】         | 최종길                                     |
| 【성명의 영문표기】         | CHIO, Jong Gi I                         |
| 【주민등록번호】           | 771116-1777913                          |
| 【우편번호】             | 305-701                                 |
| 【주소】               | 대전광역시 유성구 구성동 한국과학기술원 서측기숙사 4322호       |
| 【국적】               | KR                                      |
| 【심사청구】             | 청구                                      |
| 【핵산염기 및 아미노산 서열목록】 |   |
| 【서열개수】             | 014                                     |
| 【서열목록의 전자문서】       | 첨부                                      |



【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이한영 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 28 면 28,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 10 항 429,000 원

【합계】 486,000 원

【감면사유】 정부출연연구기관

【감면후 수수료】 243,000 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)\_1통



【요약서】

【요약】

본 발명은 코돈 검색 알고리즘을 사용하여 선택된 코돈 영역 전체의 돌연변이 여부를 검색할 수 있는 탐침의 제조방법, 전기 방법으로 제조된 탐침을 이용한 DNA 칩의 제조방법, 전기 제조방법으로 제조된 DNA 칩 및 전기 DNA 칩을 이용한 돌연변이의 검색방법에 관한 것이다. 본 발명의 탐침의 제조방법은 특정 유전질환 환자에서 나타나는 변이 코돈을 선정하는 공정; 및, 선정된 변이 코돈을 7개 이상의 염기로 구성된 DNA 탐침의 중앙 근처에 위치시키고, 변이 코돈 이외의 염기는 정상인의 염기와 동일하며, 3'에 아민기가 결합되도록 탐침을 제조하는 공정을 포함하고, 본 발명의 DNA 칩의 제조방법은 전기 탐침을 고체표면에 고정하는 공정을 포함한다. 본 발명의 DNA 칩을 이용하면 이전의 알고리즘에 의한 탐침의 설계에서 나타난 부정확한 결합으로 인한 잘못된 결과의 해석 가능성을 배제할 수 있고, 이질 돌연변이와 동질 돌연변이를 쉽게 구별할 수 있고, 다양한 유전질환의 원인이 되는 돌연변이 여부와 그 종류를 정확하고 신속히 진단할 수 있을 뿐만 아니라, 코돈 검색 알고리즘에 의해 제작된 DNA 칩을 모든 종류의 유전질환의 검사와 SNP와 같은 유전자 변이의 진단에 적용할 수 있을 것이다.

【대표도】

도 1

【색인어】

DNA 칩, 코돈 검색 알고리즘



**【명세서】****【발명의 명칭】**

코돈 검색 알고리즘을 이용한 DNA 칩{DNA Chip Using Codon Scanning Algorithm}

**【도면의 간단한 설명】**

도 1은 14종의 검색영역에 대한 각각 12개의 탐침을 유리판에 고정화시킨 DNA 칩을 나타내는 모식도이다.

도 2a는 결합과 세척 과정을 수행하지 않은 DNA 칩을 나타낸 사진이다.

도 2b는 결합과 세척 과정을 수행한 DNA 칩을 나타내는 사진이다.

도 3a는 본 발명의 DNA 칩을 사용하여 정상인의 돌연변이를 검색한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3b는 본 발명의 DNA 칩을 사용하여 환자의 돌연변이를 검색한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4a는 본 발명의 DNA 칩을 사용하여, 한국인에게서 호발하는 돌연변이를 검색한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4b는 본 발명의 DNA 칩을 사용하여, 서양인들에게서 호발하는 돌연변이와 인산 결합 부위에 나타나는 돌연변이를 검색한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4c는 본 발명의 DNA 칩을 사용하여, ATP와 반응하는 부위에 나타나는 돌연변이를 검색한 결과를 나타내는 그래프이다.



도 4d는 본 발명의 DNA 칩을 사용하여, 힌지 부위에 대한 돌연변이를 검색한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 본 발명의 DNA 칩을 사용하여, 환자가 가진 Arg778Leu 돌연변이를 검색한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6은 본 발명의 DNA 칩을 이용하여, 유전자 동시 증폭방법으로 증폭된 정상인의 유전자를 검색한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7a는 본 발명의 DNA 칩을 사용하여 환자의 Ala874Val 돌연변이를 검색한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7b는 본 발명의 DNA 칩을 사용하여 환자의 Leu1083Phe 돌연변이를 검색한 결과를 나타낸 그래프이다.

#### 【발명의 상세한 설명】

#### 【발명의 목적】

#### 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<14> 본 발명은 DNA 칩(chip)에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 코돈 검색 알고리즘을 사용하여 선정된 코돈 영역 전체의 돌연변이 여부를 검색할 수 있는 탐침의 제조방법, 전기 방법으로 제조된 탐침을 이용한 DNA 칩의 제조방법, 전기 제조방법으로 제조된 DNA 칩 및 전기 DNA 칩을 이용한 돌연변이의 검색 방법에 관한 것이다.



<15> 최근 게놈 프로젝트들이 완료되어 감에 따라, 생명현상의 기본이 되는 유전자에 대한 관심이 고조되고 있다. 현재 10여만 개로 예측되는 인간 유전자 중 1만여 개의 기능이 밝혀져 있고, 이러한 유전자들은 대부분이 질환과 직접적인 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 이러한 질환 관련 유전자 내에 돌연변이가 생겨 발현되는 단백질이 제 기능을 수행하지 못함으로써 발병하는 유전질환에 대한 연구와 그 진단방법에 대한 관심도 고조되고 있다. 현재까지 알려진 유전 질환의 경우에는 조기 진단을 수행할 수 있다면, 그 질환의 발병을 미리 막을 수 있으나, 관련 진단기술과 정보의 부족으로 조기진단에 어려움이 있다. 따라서, 이를 해결할 수 있는 기술개발이 요구되었고, 최근 등장한 DNA 칩 기술이 하나의 대안으로 제시되고 있다.

<16> 예를 들어, 유리 등의 고체 표면에 다수의 DNA 탐침을 고정시킨 DNA 칩 기술은 이전의 생물학적 방법으로는 불가능하였던, 다수의 시료를 빠른 시간 내에 다양한 조건에서 동시에 검색할 수 있다는 장점으로 인해 각광받고 있다(참조: Shena, M., *et al*, *Science*, 270:467-470, 1995). DNA 칩을 이용한 응용 분야는 크게 유전자 발현정도의 검색과 SNP(Single Nucleotide Polymorphism) 등의 돌연변이 검색으로 나눌 수 있다(참조: Halushka, M., *et al*, *Nature Genetics*, 22:239-247, 1999). 현재, DNA 탐침을 고정화하여 SNP나 돌연변이 검색에 이용하는 대표적인 DNA 칩은 아피메트릭스사(Affymetrix, CA, USA)에 의해 생산되는 GeneChip™이다(참조: [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)). GeneChip™의 제조에는 반도체 공정에 사용되는 포토리소그래피(photolithography)와 DNA 합성법(solid phase synthesis)이 응용되고 있는데, 이 방법은 고체 지지체 위에 직접 DNA를 합성하



는 방법으로서 현재 10만개 이상의 DNA 탐침을 가진 DNA 칩을 제작하는데 사용되고 있고, 다수의 DNA 단편을 균일한 양으로 동시에 제작할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 하지만, 이러한 포토리소그래피 방법에는 필수적으로 포토마스크(photomask)를 제작하여 사용하여야 하는데, 이러한 포토마스크의 제작에는 많은 노력과 비용이 소요된다. 또한, DNA 칩을 제작하는 전체 공정에 엄청난 장비를 필요로 하여 제작비용이 높을 수밖에 없고, 원하는 탐침만을 다양하게 제작하기 힘들며, 한번 제작된 칩에는 더 이상 추가로 탐침을 삽입할 수 없다는 단점을 가지고 있다. 이러한 이유로 인해 포토리소그래피를 이용한 방법은 원하는 돌연변이를 선택적으로 쉽게 검색할 수 있는 DNA 칩의 제작방법으로는 부적당하다.

<17> 또한, 원하는 탐침만을 외부에서 제작하여 고정화할 수 있는 스폿팅(spotting) 방법이 주로 cDNA 칩의 제작에 이용되어 왔다. 이때, DNA 탐침을 고정화하는 방법은 탐침의 종류에 따라 달라지게 되는데 탐침이 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction: PCR)의 산물을 이용하는 cDNA 칩의 경우, PCR 산물의 티민기와 고체표면 위의 폴리라이신(polylysine)의 아민기 사이의 화학반응을 통해 고정화시킬 수 있지만(참조: Southern E.,



*et al, Nature Genetics*, 21:5-9, 1999), DNA 단편을 이용한 DNA 칩의 경우에는 단지 20개 내외의 염기로 이루어진 DNA 단편을 탐침으로 사용하기 때문에, 상기와 같은 화학반응으로는 DNA 탐침을 고정화시킬 수 없었다. 이러한 문제로 인해, 현재까지 DNA 단편을 스폿팅을 통하여 고정화한 DNA 칩보다는 고체 표면위에 직접 합성하는 포토리소그래피 방법을 이용하여 제작한 DNA 칩만이 상용화되었고, DNA 단편의 경우에는 다량의 탐침을 고정화할 수 있는 나일론막(nylon membrane)이나 고분자 젤(gel)로 입혀진 유리판을 주로 이용하였다(참조 Ramsay G., *et al, Nature Biotechnology*, 16:40-44). 따라서, 비용이 많이 드는 포토리소그래피 방법을 배제하고도 DNA 단편을 탐침으로 고정화하여 변이진단을 수행할 수 있는 DNA 칩을 개발하는 것이 당업계의 시급한 문제의 하나이다.

<18> 현재까지 돌연변이를 검색하기 위해 요구되는 DNA 탐침의 설계방법으로 두 가지 방법이 개발되어 보고되었다(참조: Hacia, J. D., *et al., Nature Genetics*, 21:42-47, 1999). 모든 가능한 돌연변이에 대해서 상보적인 탐침을 제작하는 신호획득(gain of signal) 알고리즘과 일정 길이의 DNA 단편을 한 염기서열씩 이동하면서 상보적인 결합 여부를 검색하는 신호손실(loss of signal) 알고리즘이 그것인데, 이들은 탐침을 이용한 선택된 돌연변이의 검색보다는 포토리소그래피를 통해 제작된 다수의 탐침을 이용, 전체적인 염기서열을 분석함으로써 돌연변이를 선별해 내는데 이용되고 있다.

<19> 신호획득(gain of signal) 알고리즘은 검색할 영역과 완벽히 일치하는 염기서열을 가진 탐침만이 결과를 나타내게 되는 방법으로써, 각각의 돌연변이 위치에 대해 아데닌, 구아닌, 시토신 및 티민의 가능한 모든 염기가 삽입된 DNA 탐침



을 합성한다. 따라서, 특정 위치의 염기가 다른 염기로 대체된 치환(substitution), 삽입(insertion) 및 결실(deletion) 돌연변이에 대해 상보적 결합이 가능한 모든 수의 DNA 단편(oligonucleotide)을 제작하게 된다. 현재, 이 방법으로 설계된 탐침을 이용하여 염기서열을 알아낼 경우, 90% 이상의 정확성을 보여주고 있지만, 삽입 돌연변이의 경우 각각의 탐침에서 발생하는 부정확한 결합(mismatching)을 제거하기 힘들다는 단점이 있고, 여러 다양한 탐침 중 특정 탐침에서만 결과가 나타나야 하지만 검색시 필연적으로 나타나는 부정확한 결합으로 인해 결합 및 세척 조건을 최적화하지 않고서는 실질적으로 검색과 분석이 힘들다는 문제점을 지니고 있다.

<20> 신호손실 알고리즘은 검색 대상 DNA와 탐침 사이의 부정확 결합에 의한 신호의 손실을 검색하는 방법으로서, 검색 대상 DNA 염기 서열 하나씩을 이동하며 일정 길이의 DNA 단편 탐침을 제작하기 때문에, 제작된 탐침 사이에 중복(overlapping)이 일어나는 특징을 갖는다. 신호손실 방법을 사용할 경우, 이질 돌연변이(heterozygote mutation)에 대해서는 검색시 50%의 발광정도의 손실이 발생하고, 동질 돌연변이(homozygote mutation)에 대해서는 100%의 신호손실이 발생한다. 신호손실 알고리즘을 사용할 경우, 돌연변이가 존재하면 중복된 여러 탐침에서 상보적 결합이 이루어지지 않기 때문에, 보다 정확하게 돌연변이의 존재 여부를 검색할 수 있다. 그러나, 돌연변이의 종류를 판별하기 어려우며, 정확한 돌연변이 정보는 신호손실이 발생한 부위에 대해 추가적인 염기서열분석을 수행해야만 판별이 가능하다는 단점이 있다. 또한, 동질과 이질 돌연변이의 구별을 위해서는 고정화된 탐침의 양이 일정해야 하기 때문에, 정확한 해석을 위해



서는 높은 제작비용이 소요되는 포토리소그래피를 이용해야만 한다는 제한이 있다.

<21> 따라서, 상술한 종래 기술의 단점을 극복하기 위하여, 정확한 돌연변이의 판별을 경제적으로 수행할 수 있는 DNA 칩을 개발하여야 할 필요성이 끊임없이 대두되었다.

**【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】**

<22> 이에, 본 발명자들은 정확한 돌연변이의 판별을 경제적으로 수행할 수 있는 DNA 칩을 개발하고자 예의 노력한 결과, 검색하고자 하는 돌연변이 위치를 포함한 연속된 세 개의 DNA 염기를 변이 코돈으로 지정하고, 이를 검색하는 코돈 검색 알고리즘(codon scanning algorithm)에 기초하여 탐침을 제조하였으며, 전기 탐침을 원하는 위치에 자유롭게 고정화할 수 있는 스폿팅(spotting)과 아민-알데히드 반응을 이용한 DNA 칩을 제조하였는 바, 전기 방법으로 제조된 DNA 칩을 사용하여 정확한 돌연변이의 판별을 간단하면서도, 경제적으로 수행할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

<23> 결국, 본 발명의 첫 번째 목적은 유전자 돌연변이를 검색할 수 있는 코돈 검색 알고리즘을 이용한 탐침의 제조방법을 제공하는 것이다.

<24> 결국, 본 발명의 두 번째 목적은 전기 제조방법으로 제조된 탐침을 이용한 DNA 칩의 제조방법을 제공하는 것이다.



<25> 결국, 본 발명의 세 번째 목적은 전기 제조방법으로 제조된 DNA 칩을 제공하는 것이다.

<26> 결국, 본 발명의 네 번째 목적은 전기 DNA 칩을 이용하여 유전자의 돌연변이를 검색하는 방법을 제공하는 것이다.

#### 【발명의 구성 및 작용】

<27> 본 발명자들은 코돈 검색 알고리즘을 이용하여 설계하고 제조된 탐침을 스폿팅 방법으로 고체 표면에 고정화시켜 DNA 칩을 제조하였는 바, 전기 탐침의 제조에 이용된 코돈 검색 알고리즘이란 알려진 신호획득과 신호손실 알고리즘을 접목함으로써 각각의 알고리즘으로 설계된 탐침의 단점을 보완한 알고리즘이다. 전기 알고리즘을 이용한 탐침의 제조방법은 특정 유전질환 환자에서 나타나는 변이 코돈을 선정하는 공정; 및, 선정된 변이 코돈을 7개 이상의 염기로 구성된 DNA 탐침의 중앙 근처에 위치시키고, 변이 코돈 이외의 염기는 정상인의 염기와 동일하며, 3'에 아민기가 결합되도록 탐침을 제조하는 공정을 포함한다.

<28> 이하, 본 발명의 탐침의 제조방법을 공정별로 나누어 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

<29> 제 1공정: 변이 코돈의 선정



<30> 특정 유전질환 환자에서 나타나는 변이 코돈을 선정한다: 특정 유전질환 환자에서 나타나는 변이 코돈을 선정할 때, 유전자 변이인 경우에는 변이 위치의 염기를 포함한 변이 코돈(codon)을 선택하고, 단백질의 아미노산 변이인 경우에는 변이 아미노산을 코딩하는 코돈을 선택하여, 하나의 특정 유전질환에 대하여 N개의 변이 코돈을 선정하며, N은 특정 유전질환에 대한 변이 코돈의 수로서 1 이상의 자연수이다.

<31> 제 2공정: 탐침의 제조

<32> 선정된 변이 코돈을 7개 이상의 염기로 구성된 DNA 탐침의 중앙 근처에 위치시키고, 변이 코돈 이외의 염기는 정상인의 염기와 동일하며, 3'에 아민기가 결합되도록 탐침을 제조한다: 이때, 전기 선정된 N개의 변이 코돈 중 특정 변이 코돈을 7개 이상의 염기로 구성된 탐침의 중앙에 위치시키고, 변이 코돈 이외의 염기는 정상인의 염기와 동일하도록 설계하는데, 전기 변이 코돈의 첫 번째 염기가 각각 A, G, C, T이고, 코돈의 나머지 두 염기는 정상인의 염기서열과 동일한 4개의 탐침을 설계하고, 전기 변이 코돈의 두 번째 염기가 각각 A, G, C, T이고, 코돈의 나머지 두 염기는 정상인의 염기서열과 동일한 4개의 탐침을 설계하며, 전기 변이 코돈의 세 번째 염기가 각각 A, G, C, T이고, 코돈의 나머지 두 염기는 정상인의 염기서열과 동일한 4개의 탐침을 설계하여, 하나의 변이 코돈에 대하여 12개의 탐침을 제조한다.



- <33> 이를 이용하면 돌연변이의 존재 여부와 종류를 정확히 알아낼 수 있는 DNA 탐침의 설계 및 DNA 칩의 제작이 가능하게 된다. 상기 DNA 탐침을 이용하여 염기서열을 검색할 시에, 최소 7개 이상으로 이루어진 탐침을 사용하고, 검색 위치를 탐침의 중앙쪽에 잡을수록 탐침과 염기서열 사이의 상보적인 결합 결과를 보다 정확히 확인할 수 있다는 사실은 당업계에서는 자명한 사실이다.
- <34> 또한, 본 발명의 코돈 검색 알고리즘을 이용하면, 복수개의 유전질환에 대한 DNA 탐침을 설계할 수도 있는 데, 이를 구체적으로 설명하면, 복수개(D개)의 유전질환에 대하여 상기의 단계를 반복하여 총( $12N \cdot D$ )개의 DNA 탐침을 설계할 수 있다.
- <35> 본 발명의 DNA 칩의 제조방법은 전기 제조된 탐침을 스폿팅(spotting) 방법으로 고체표면에 고정하여 DNA 칩을 제조하는 공정을 포함한다: 전기 제조된 아민기가 결합된 탐침을 1 내지 7X, 바람직하게는 2 내지 5X, 가장 바람직하게는 3X SSC(0.45M NaCl, 15mM  $C_6H_5Na_3O_7$ , pH 7.0) 완충용액에 용해시키고, 마이크로어레이어(microarrayer)를 이용하여 알데히드가 결합된 고체표면에 스폿팅한 후, 반응시켜서 탐침을 고체표면에 고정시킨다. 이때, 탐침이 고정되는 고체는 특별히 제한되는 것은 아니나, 유리판을 사용함이 바람직하고, 탐침의 농도는 10 pmol/ $\mu$ l 이상, 바람직하게는 50 pmol/ $\mu$ l 이상, 가장 바람직하게는 100 pmol/ $\mu$ l 이상이며, 탐침에 결합된 아민기와 고체에 결합된 알데히드를 70 내지 90%, 바람



직하게는 80%의 습도조건하에 4 내지 8시간, 바람직하게는 5 내지 7시간, 가장 바람직하게는 6시간동안 반응시켜 결합시킨다.

<36> 본 발명의 DNA 칩을 이용한 돌연변이의 검색방법은 검색할 유전자와 형광물질이 결합된 프라이머를 사용한 PCR을 수행하여, 형광물질이 결합된 검색시료를 수득하는 단계; 수득한 검색시료를 DNA 칩에 가하여, 10 내지 37℃에서 3 내지 13시간 동안 반응시키고, 반응시킨 DNA 칩을 세척하는 단계; 및, 세척된 DNA 칩에 잔류한 형광물질의 양을 측정하는 단계를 포함한다. 이때, 검색시료와 DNA 칩의 반응은 3 내지 10X 결합완충용액(SSPE: 0.15M NaCl, 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 1mM EDTA, pH 7.4)에서 수행되고, 반응 온도는 10 내지 37℃, 바람직하게는 20 내지 30℃, 가장 바람직하게는 35℃이고, 반응 시간은 3 내지 13시간, 바람직하게는 6 내지 10시간, 가장 바람직하게는 8시간 이상이다. 또한, DNA 칩의 세척은 1차 세척액(3X SSPE)으로 5분간 수행한 후, 연속하여 2차 세척액(2X SSPE)으로 5분간 수행하는 것이 바람직하다.

<37> 본 발명의 DNA 칩은 선택된 돌연변이를 정확히 검색할 수 있고, 선택된 돌연변이를 DNA 칩의 집적화를 높임으로써 만개 이상 동시에 검색하도록 제작할 수 있기 때문에 돌연변이가 원인이 되는 모든 종류의 유전질환 뿐만이 아니라, SNP 등의 변이 진단에도 적용할 수 있다. 또한, 주위 염기를 포함한 지정된 한 코돈 전체에 대해서 결과를 검색함으로써, 기존의 알고리즘을 이용한 DNA 탐침 설계에서 나타나는 부정확한 결합으로 인한 결과해석의 오류를 배제할 수 있다. 아



올려, 결과 검색시 나타나는 신호가 동질 돌연변이일 경우 단 하나의 돌연변이 신호만이 검출되고, 이질 돌연변이일 경우 정상과 돌연변이 신호가 함께 검출되어, 이질 돌연변이와 동질 돌연변이를 쉽게 구별하는 등 돌연변이 존재 여부와 그 종류를 정확히 진단할 수 있다.

<38> 본 발명의 일 실시예로서, 상기와 같은 단계를 통해 유전질환인 윌슨씨 병을 진단할 수 있는 DNA 칩을 제작하였다. 탐침에 의해 검색할 코돈은 윌슨씨 병 환자에게서 나타나는 아미노산 변이를 지정하는 유전자 코돈으로 설정하여 DNA 탐침을 제작하였다. 대표적인 유전질환의 하나인 윌슨씨 병(Wilson disease)은 구리를 배출하는 유전자에 이상이 생겨 간과 신경조직에 구리가 축적되어, 그 기능이 저해됨으로 인해 발병하는 유전질환이다. 현재까지 윌슨씨 병을 비롯한 유전질환의 진단법으로 각각의 모든 엑손(exon)을 각각에 특이적인 PCR 마커(marker)를 이용하여 증폭한 후(참조: Tumer, Z., *et al*, *Am. J. Hum. Genet.*, 60:63-71, 1997), 획득한 DNA의 염기서열을 구하여, 밝혀진 돌연변이 데이터베이스와 비교해 보는 방법을 사용해 왔다. 따라서, 각 엑손을 얻기 위한 PCR과 염기서열분석(sequencing)을 위한 PCR이 요구되었고, 전체 염기서열로부터 돌연변이를 일일이 확인해야 했기 때문에, 진단을 내리기까지 많은 시간과 비용이 소요되는 문제점이 있었다.

<39> 본 발명에서 개발한 코돈 검색 알고리즘을 대표적인 유전질환인 윌슨씨 병에 적용하여 DNA 칩을 제작함으로써 이전의 복잡하고 비용이 많이 드는 진단에 비해, 간단·용이하고, 정확하게 저 비용으로 윌슨씨 병을 진단할 수 있는지 확인



하였다. 우선, 월슨씨 병 환자에서 나타나는 아미노산 변이를 코딩하는 DNA 유전자 코돈을 검색 코돈으로 지정하여, 본 발명의 코돈 검색 알고리즘을 적용해서 DNA 탐침들을 제작하였다. 제작된 탐침은 스폿팅 및 아민과 알데히드 사이의 결합으로 유리판 위에 고정화하여, 월슨씨 병 진단용 DNA 칩을 제조하였다. 또한, 동시 중합효소 연쇄 증폭 과정을 통해 각각의 검색영역을 보다 용이하게 획득할 수 있는 방법을 제시하였다. 그런 다음, 정상인의 유전자를 이용하여 우선적으로 실험하여, 나타나는 신호의 세기를 분석하는 결과해석 기준을 정하여, 환자의 유전자 검색 결과에 적용한 결과, 성공적인 진단을 수행할 수 있었다. 아울러, 한국인에게서 나타나는 두 가지 돌연변이를 추가로 삽입한 DNA 칩을 제작하여, 한국인에게서 나타나는 것으로 보고된 모든 교환돌연변이를 포함, 16가지의 돌연변이를 검색할 수 있는 DNA 칩을 제작하여 월슨씨 병 환자의 유전자 검사에 성공적으로 적용됨을 확인함으로써, 본 발명의 DNA 칩이 각종 유전질환의 진단에 유용하게 사용될 수 있다는 것을 입증할 수 있었다.

<40> 따라서, 본 발명의 DNA 칩 제작 방법이나 스폿팅을 통한 DNA 탐침의 고정화 방법은 월슨씨 병 관련 유전자뿐만이 아니라, 다른 유전자 돌연변이에 의한 유전병 진단 및 여러 가지의 유전병의 동시 진단 등에 적용할 수 있을 것이다.

<41> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이므로, 본 발명의 코돈 검색 알



고리즘을 통해 제조된 각종 유전질환 진단용 DNA 칩 또한 본 발명의 범주에 속한다고 보아야 할 것이다.

<42>      실시예 1: 검색할 돌연변이의 선정

<43>      월슨씨 병을 대상으로한 돌연변이 진단용 DNA 칩을 제작하기 위하여, 검색할 돌연변이를 선정하였다. 성공적인 월슨씨 병의 진단을 위해서 이상이 생길 경우 월슨씨 병의 원인이 되는 단백질인 ATP7B의 유전자 정보에 대해서 NCBI(National Center for Biotechnology Information) 유전자 관련 데이터베이스인 GenBank와 OMIM(Online Mendelian Inheritance in Man)을 통하여 DNA 염기서열과 아미노산 서열을 분석 확보하였고, 각 질환 대립형질(allele)에 대한 정보도 확보하였다. 또한, 상기 확보한 아미노산 서열 정보와 기존의 문헌보고(참조: 김은경, 한국과학기술원 박사학위논문, 1999)를 바탕으로 하여 ATP7B 내에 존재하는 기능성 단백질 단편을 조사하였다. 기능성 단백질 단편이란 단백질의 특정 기능을 대표하는 짧은 아미노산 서열을 지칭하고, ATP7B의 기능성 단백질 단편으로서는 단백질의 N-말단 쪽에 구리 결합 단백질 단편(copper-binding motif)인 GMTCXXC, TGES/A의 아미노산 서열을 보이는 트랜스덕션 영역(transduction domain)과 양이온 채널(cation channel) 단편인 CPC 및 인산과 반응하는 영역(phosphate domain)인 DKTGT가 존재함을 확인하였으며, C-말단 쪽으로 ATP 결합 영역(ATP binding domain)을 나타내는 TGDN과 힌지(hinge region)



영역인 MXGDXNDX가 존재함을 알 수 있었는데, 여기서 X는 특정 아미노산이 아닌 임의의 아미노산을 의미한다. 유전질환 관련 돌연변이 데이터베이스인 HGMD(the Human Gene Mutation Database)에 의하면 상기 기능성 단백질 단편 중, 중요한 기능을 하는 인산과 반응하는 영역, ATP 결합 영역 및 힌지 영역에 12종의 치환 돌연변이에 의하여 생성된 12종의 단백질로 인한 월슨씨 병의 발병이 보고되었는데, 전기 12종의 단백질 중, Asn1270의 경우에는 한국인에게서도 돌연변이가 나타나는 것으로 보고되어 있다. 이에, 본 발명자들은 전기 12종의 단백질, 한국인 월슨씨 병 환자에 대한 연구에서 37.5%의 대립형질 빈도로 한국인에게서 특이적으로 호발하는 Arg778Leu(참조: Kim, E. K., *et al*, *Hum. Mutat.* 11:275-278, 1998) 및 서양인에게서 호발하는 것으로 보고된 His1069Gln(참조: Payne, A., , 95:10854-10859, 1998)을 포함하는, 총 14종의 돌연변이성 단백질을 생산하는 치환 돌연변이를 검색 영역으로 선정하였다.

<44>     실시예 2: 중합효소연쇄반응을 통한 검색 영역의 획득

<45>     상기 14개의 돌연변이를 검색하기 위해서는 모두 4쌍의 PCR 프라이머를 제작하였다. 한국인에게서 호발하는 778Arg 영역(91bp)을 증폭하기 위하여 프라이머 1: 5'-GCCCTGTGACATTCTTCGA-3'(서열번호 1)과 프라이머 2: 5'-GCTGCTGTTACCTTTGCC A-3'(서열번호 2)를 설계하였다. 이때, 검색할 DNA 탐침과 상보적인 가닥의 프라이머의 5' 끝 부분 하이드록실기(Hydroxyl residue)에



형광을 나타내는 플루오레세인 포스포아미다이트(Fluorescein phosphoamidite, F, Molecular Dynamics, CA, USA)를 결합시켰다. 서양인에게서 호발하는 1069His과 인산과 반응하는 영역은 같은 엑손상에 위치(173bp)하여 프라이머 3: 5'-GATGTTTGACAAGACTGGCA-3'(서열번호 3)과 프라이머 4: 5'-CCTCTTTACAGTATTTGGTGA-3'(서열번호 4)를 이용하여 증폭시켰다. ATP와 결합하는 영역(128bp)의 경우에는 프라이머 5: 5'-CAATCGCAGACGCTGTCAA -3'(서열번호 5)와 프라이머 6: 5'-CTGTACCTGGGTGGCAATA-3'(서열번호 6), 힌지 영역(90bp)의 경우에는 프라이머 7: 5'-TAAAGGGAAGAAAGTCGCA-3'(서열번호 7)과 프라이머 8: 5'-GCTGCCTCGATGGCCACA-3'(서열번호 8)을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 50  $\mu$ l 전체 반응부피로 하여 혈액에서 채취한 100ng이상의 DNA를 주형으로 하여 다음과 같이 수행하였다: 즉, 첫 번째 변성은 96℃에서 8분간 1회 수행하고; 이후 두 번째 변성은 92℃에서 1분간, 교잡은 57℃에서 1분간, 연장은 72℃에서 30초간 수행하며, 이를 30회 반복하고; 이후 72℃에서 7분간 마지막 연장을 1회 수행하였다.

<46> PCR 프라이머의 설계과정에서 일부 프라이머들 간의 결합(primer dimerization)을 방지하기 위하여, DNA 중합 효소(polymerase)가 결합하는 3'의 끝을 가급적 아데닌으로 통일하여 제작하였고, 모든 프라이머의 결합온도(annealing temperature)를 58℃ 근처에서 통일하여 한번 반응에서 위 네 산물이 동시에 증폭이 가능하도록 하였다.

<47> 실시예 3: 돌연변이 검색을 위한 탐침의 제조



<48>      상기 14가지의 교환 돌연변이를 검색하기 위하여, 상술한 코돈 검색 알고리즘을 이용하여 탐침을 제작하였다: 즉, 한 개의 아미노산 변이를 나타내는 유전자 염기서열을 검색하기 위하여, 특정 아미노산을 지정하는 세 개의 염기로 이루어진 한 코돈을 검색 코돈으로 지정하였다. 또한, 지정된 각 코돈을 검색하기 위하여, 전체 15개의 염기로 이루어진 DNA 단편 탐침에서 가운데 위치인 8번째 염기만을 A, G, C, T로 각각 삽입하고, 그 외의 위치에는 정상인의 염기서열을 갖도록 하여, 모두 네 종류 탐침을 설계하였으므로, 결과적으로 하나의 아미노산 변이를 검색하기 위하여 12개의 탐침을 제작하였다.

<49>      정상인이 가지는 코돈의 염기서열에 대한 탐침은 12가지의 한 아미노산 검색 탐침 중, 1번(정상 아미노산 코돈의 첫 번째 염기), 5번(정상 아미노산 코돈의 두 번째 염기) 및 9번(정상 아미노산 코돈의 세 번째 염기) 탐침이 되도록 설계하고, 이는 모든 검색할 아미노산에 대해 같은 방법으로 적용하였다. 예를 들면, Arg778(1번 아미노산으로 정함)의 경우 1-1(15mer 탐침의 가운데 위치인 8번째 위치에 C가 존재), 1-5(G), 1-9(G)에서 정상적인 코돈 염기서열임을 검색할 수 있도록 하여, Arg778Leu 돌연변이를 가진 환자의 경우에는 CGG가 아닌 CTG의 염기서열을 가져 상기 정상 탐침에서는 결과가 나타나지 않고, 단지 CTG와 상보적인 1-8 탐침에서만 돌연변이 결과를 얻을 수 있도록 하였다.

<50>      상기와 같은 방법으로 His1069(2번 아미노산), Gly1035(3번 아미노산), Arg1038(4번 아미노산), Arg1041(5번 아미노산), Gly1213(6번 아미노산), Val1216(7번 아미노산), Thr1220(8번 아미노산), Asp1222(9번 아미노산),



Gly1266(10번 아미노산), Asp1267(11번 아미노산), Asn1270(12번 아미노산), Pro1273(13번 아미노산) 및 Ala1278(14번 아미노산)에 대해서 탐침을 설계하고, 상기 각각의 아미노산을 검색하는 탐침 중, 2-10(His1069Gln), 3-8(Gly1035Val), 4-6(Arg1038Lys), 5-4(Arg1041Trp), 6-8(Gly1213Val), 7-2(Val1216Met), 8-8(Thr1220Met), 9-4(Asp1222Tyr), 10-2(Gly1266Arg), 10-8(Gly1266Val), 11-6(Asp1267Ala), 12-7(Asn1270Ser), 13-8(Pro1273Leu) 및 14-8(Ala1278Val)에 서는 돌연변이를 나타내는 탐침으로 제조하였다. 전기 설계된 탐침들을 제조할 때, 3' 첫 번째 염기를 아미노링커컬럼(Aminolinker column, Cruachem, Glasgow, Scotland)을 이용하여 아민기(amine residue)를 가진 염기를 삽입하였다.

<51>      실시예 4: DNA 탐침의 고정화

<52>      실시예 3에서 제조된 탐침을 유리판 위에 고정화시키기 위하여, 3X SSC(0.45M NaCl, 15mM  $C_6H_5Na_3O_7$ , pH 7.0)의 완충용액 조건하에, 전기 탐침을 알데하이드기(aldehyde residue)로 입혀진 유리판(CEL Associates, Inc. Houston, Texas, USA)에 마이크로어레이어(microarrayer)를 이용하여 스폿팅한 후(참조: Yoon, S. H., *et al*, *J. Microbiol. Biotechnol.* 10(1), 21-26, 2000), 80% 이상의 습도가 유지되는 조건에서 2시간 동안 아민-알데히드 결합반응시킨 다음, 6시간 동안 방치



하여 탐침을 고정화하였다. 이때, 기준탐침(control)의 농도는  $10\mu\text{M}$ 의 농도로 고정화하고, 돌연변이 검색탐침은  $100\mu\text{M}$ 의 농도로 고정화하였다(참조: 도 1). 또한, 검색결과를 용이하게 측정하기 위하여, 각 탐침의 5'에 플루오레세인 포스포아미다이트로 표지하였다. 도 1은 전기 14종의 검색영역에 대한 각각 12개의 탐침을 유리판에 고정화 시킨 DNA 칩을 나타내는 모식도로서, 돌연변이 검색 탐침 168개와 120개의 기준 탐침을 포함하여 전체 288개의 탐침이 일정 위치에 순서대로  $0.8\text{cm}^2$  면적에 집적되었다. 이때, 도면에서 짙은 색으로 표시된 탐침은 정상 염기서열에 대한 탐침을 나타내고 C는 기준 탐침을 나타낸다.

<53> 탐침과 유리판의 고정화 정도를 알아보기 위하여 결합(hybridization)과 세척과정(washing)을 수행하였다. 형광물질을 가진 탐침이 없는  $10\mu\text{l}$ 의 6X 결합완충용액(SSPE:  $0.15\text{M NaCl}$ ,  $10\text{mM NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ ,  $1\text{mM EDTA}$ , pH 7.4)에서  $37^\circ\text{C}$ 에서 12시간 동안 반응을 유도하고, 3X SSPE를 이용하여 5분, 2X SSPE를 이용하여 5분간 순서대로 세척한 다음, 2X SSPE를 이용하여 5분간 마지막으로 세척한 후, ScanArray5000(GSI Lumonics Inc., Bedford, MA, USA)를 이용하여 결과를 검색하였다(참조: 도 2a, 도 2b). 도 2a는 결합과 세척 과정을 수행하지 않은 DNA 칩을 나타낸 사진이고, 도 2b는 전기 과정을 수행한 DNA 칩을 나타내는 사진으로서, 고정화된 기준 탐침의 양으로 보아, 결합과 세척 과정 후에도 충분히 해석 가능한 양의 탐침이 남아있음을 알 수 있었다.

<54> 실시예 5: DNA 단편 표시자를 이용한 DNA 칩의 기능성 검사



- <55>      상기 제작한 DNA 칩의 기능성을 검사하고, 결합조건을 최적화하기 위해서, 고정화된 탐침과 상보적으로 결합할 수 있는 DNA 단편 표시자(reporter)를 제작하였다. 표시자로서 한국인에게서 호발하는 돌연변이인 Arg778Leu을 선정하고, 정상인과 돌연변이를 가진 환자에 대한 두 가지 표시자를 제작하였다. 정상인에 대한 표시자는 5'-CAGCCACCCGCCCCAGG-3'(서열번호 9)이고, 월슨씨 병 환자에 대한 표시자는 5'-CCAGCCACAGGCCCCAGG-3'(서열번호 10)이며, 모든 표시자는 신호를 나타낼 수 있도록 5'에 형광물질인 플루오레세인 포스포아미다이트로 표지하였다.
- <56>      상기에서 제작한 표시자를 0.1  $\mu$ M의 농도로 포함하는 10  $\mu$ l의 3X, 4X, 5X, 6X, 7X SSPE를 제조하고, 실온과 30℃, 37℃에서 4시간 동안 상보적인 결합을 유도하였다. 이어, 3X SSPE를 이용하여 5분, 2X SSPE를 이용하여 5분간 순서대로 세척하고, 1X SSPE를 이용하여 5분간 마지막으로 세척한 후, ScanArray5000을 이용하여 결과를 검색하였다(참조: 도 3a, 도 3b). 도 3a는 DNA 칩을 사용하여 정상인의 돌연변이를 검색한 결과를 나타내는 그래프이고, 도 3b는 환자의 돌연변이를 검색한 결과를 나타내는 그래프이다. 그 결과, 정상인의 경우, 도 3a에서 보듯이 정상인을 나타내는 1-1, 1-5 및 1-9 탐침에서 신호를 볼 수 있었고, QuantArray(GSI Lumonics Inc., Bedford, MA, USA)를 이용한 발광정도의 분석에서도, 다른 탐침에 비해서 전기 세 탐침이 보다 강한 신호를 보이는 사실을 알 수 있었다. 도 3b에서 보듯이, 돌연변이에 대한 표시자의 경우, 돌연변이를 나타내는 1-8 탐침만이 신호를 나타냄을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 부터 6X SSPE와 30℃에서 결합을 유도할 경우, 발광정도가 가장 뛰어남을 알 수 있었다.



<57>      실시예 6: 외편 서열 증폭을 이용한 정상인의 유전자 검사와 해석 기준의 확립

<58>      정상인의 14가지 검색영역을 각각 외편 서열 증폭을 통해 증폭한 후, DNA 칩을 이용하여 검색하였다. 양쪽 프라이머가 모두 존재하는 조건에서 PCR을 수행한 후, 이를 모체로 하여 형광 물질을 가진 한쪽 프라이머만이 존재하는 조건에서 다시 PCR을 수행하여, 형광물질을 가진 서열만을 수득할 수 있었다. 전기 수득한 서열 1 $\mu$ l를 포함하는 10 $\mu$ l의 6X SSPE에서 30℃에서 4시간 동안 상보적인 결합을 유도하고, 3X SSPE의 조건에서 5분간 세척하며, 2X SSPE로 5분간 두 번째 세척하였다. 그 결과를 ScanArray5000을 이용하여 검색하였다(참조: 도 4a, 도 4b, 도 4c, 도 4d). 도 4a는 DNA 칩을 사용하여, 한국인에게서 호발하는 돌연변이(1번 탐침)를 검색한 결과를 나타내는 그래프이고, 도 4b는 DNA 칩을 사용하여, 서양인들에게서 호발하는 돌연변이와 인산 결합부위에 나타나는 돌연변이(2~5 탐침)를 검색한 결과를 나타내는 그래프이며, 도 4c는 DNA 칩을 사용하여, ATP와 반응하는 부위에 나타나는 돌연변이(6~9 탐침)를 검색한 결과를 나타내는 그래프이고, 도 4d는 DNA 칩을 사용하여, 힌지 부위에 대한 돌연변이(10~14번 탐침)를 검색한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 4a 내지 도 4d에서 보듯이, 각각의 영역에 대해 서로 상보적인 결합을 유도한 결과, 정상인의 경우에는 778Arg(1번 탐침), 1069His(2번 탐침), 1038Arg(4번 탐침), 1041Arg(5번 탐침), 1213Gly(6번 탐침), 1216Val(7번 탐침), 1220Thr(8번 탐침), 1222Asp(9번



탐침), 1270Asn(12번 탐침), 1273Pro(13번 탐침) 및 1278Ala(14번 탐침)에서 정상이라는 결과를 얻을 수 있었다.

<59>      상기 결과를 바탕으로 하여, 정상인을 나타내는 탐침 아미노산 세 코돈 중 두 코돈 이상에서 정상 탐침의 발광정도가 가장 높을 경우 정상으로 판별하고, 돌연변이를 나타내는 탐침의 신호세기가 전체 탐침(한 아미노산에 대한 12개의 탐침을 말함) 중 가장 높을 경우에는 돌연변이로 판별하며, 돌연변이 판별에서 정상 신호와 동시에 돌연변이 탐침의 신호가 있을 경우에는 이질 돌연변이(heterogeneous mutation)로 판별하고, 돌연변이 판별에서 정상 신호의 경향은 전혀 존재하지 않고 단지 돌연변이 신호만이 있을 경우에는 동질 돌연변이(homogeneous mutation)로 판별하는 해석기준을 정할 수 있었다.

<60>      실시예 7: 외편 서열 증폭을 이용한 윌슨씨병 환자의 유전자 검사

<61>      Arg778Leu 돌연변이를 가진 윌슨씨병 환자의 14가지 검색영역을 실시예 6의 방법으로 각각 외편 서열 증폭(single strand PCR)을 통해 증폭하고, DNA 칩을 이용하여 검색하였다(참조: 도 5). 도 5는 DNA 칩을 사용하여, 환자가 가진 Arg778Leu(1번 탐침)를 검색한 결과를 나타내는 그래프로서, 각각의 영역에 대해서로 상보적인 결합을 유도한 결과, 윌슨씨 병 환자의 경우에는 한국인에게서 호



발하는 Arg778Leu에서 교환 돌연변이를 관찰할 수 있었는데, 한 쌍의 염색체 중, 한쪽은 정상인의 염기서열이지만 한쪽이 돌연변이인 이질 돌연변이 (heterogeneous mutation)임을 알 수 있고, 그 외의 다른 돌연변이에 대한 탐침에서는 정상인을 기준으로 정한 결과 분석에 의해서 1069His(2번 탐침), 1038Arg(4번 탐침), 1041Arg(5번 탐침), 1213Gly(6번 탐침), 1216Val(7번 탐침), 1220Thr(8번 탐침), 1222Asp(9번 탐침), 1270Asn(12번 탐침) 및 1273Pro(13번 탐침), 1278Ala(14번 탐침) 모두 정상이라는 결과를 얻을 수 있었다.

<62> 따라서, 상기 단계를 거쳐 제작한 DNA 칩을 이용하여 실제 윌슨씨 병을 가진 환자의 돌연변이를 검색할 수 있음을 알 수 있었다.

<63> 실시예 8: 유전자 동시 증폭을 이용한 정상인의 유전자 검사

<64> 정상인의 14가지 검색영역을, 실시예 2의 유전자 동시 증폭방법(Multiplex PCR)을 이용하여 증폭시킨 후, DNA 칩을 이용하여 검색하였다. 즉, 동시 증폭된 반응 산물 1 $\mu$ l를 포함하는 10 $\mu$ l의 6X SSPE를 제조하고, 98 $^{\circ}$ C에서 5분간 끓여 DNA를 외편(single strand)을 형성한 후, 얼음에 1분 정도 넣어 둔 후, 30 $^{\circ}$ C에서 8시간 이상 상보적인 결합을 유도하고, 3X SSPE의 조건에서 5분간 세척하며, 2X SSPE로 5분간 세척한 다음, ScanArray5000을 이용하여 검색하였다(참조: 도 6). 도 6은 DNA 칩을 이용하여, 유전자 동시 증폭된 정상인의 유전자를 검색한 결과를 나타내는 그래프로서, 14가지의 돌연변이 중 1번, 3번, 4번, 6번, 7번 및 12



번 탐침에서는 정상이라는 결과를 얻을 수 있었으므로, 이 조건을 이용할 경우, 동시에 다양한 다량의 검색영역을 보다 손쉽게 검색할 수 있고, 월슨씨 병 이외의 다른 유전병 진단도 하나의 칩을 이용 동시에 검색가능 함을 알 수 있었다.

<65>      실시예 9: 돌연변이 검색 탐침의 추가 삽입에 의한 한국인 월슨씨 병 환자 진단용 DNA 칩의 제조

<66>      월슨씨병 환자에서 나타나는 또 다른 돌연변이인 Ala874Val(15번 아미노산)과 Leu1083Phe(16번 아미노산)에 대한 탐침을 추가로 제작하여, 보다 정확한 월슨씨병의 진단과 DNA 칩의 장점인 탐침 추가의 가능성을 알아보았다. 전기 두 가지의 돌연변이에 대한 탐침은 이전 다른 돌연변이와 같은 알고리즘에 의해서 제작하여, Ala874Val의 경우 16-8번 탐침에서, Leu1083Phe의 경우 17-4번 탐침에서 돌연변이 신호가 검색될 수 있도록 하여, 16가지의 돌연변이를 검색할 수 있는 새로운 DNA 칩을 제작하였다.

<67>      두 가지의 돌연변이를 검색할 영역을 얻기 위해서 PCR 프라이머를 새로이 제작하였다. Ala874Val에 대해서는 프라이머 9: 5'-CTACGTCTAGGAGAAGCCA-3'(서열번호 11)와 프라이머 10: 5'-GAGCACAGAGCCATGTGCA-3'(서열번호 12)를 이용하여 PCR을 수행하고, Leu1083Phe에 대해서는 프라이머 11: 5'-CTTCACTTCACCCCTCT-3'(서열번호 13)과 프라이머 12: 5'-TGCCTGGAAGTCCGTGCA-3'(서열번호 14)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 전기



PCR을 통해 수득한 단편을 외편 서열 증폭과정을 통해 외편으로 제작하여, 이들의 특이적 결합측정하였다(참조: 도 7a, 도 7b). 도 7a는 DNA 칩을 사용하여 환자의 Ala874Val 돌연변이를 검색한 결과를 나타낸 그래프이고, 도 7b는 DNA 칩을 사용하여 환자의 Leu1083Phe 돌연변이를 검색한 결과를 나타낸 그래프이다. 도 7a에서 보듯이, 환자가 가진 또 다른 돌연변이인 Ala874Val을 이질 형태의 돌연변이로 성공적으로 검색할 수 있고, 도 7b에서 보듯이, Leu1083Phe 돌연변이를 가진 또 다른 환자의 돌연변이도 이질 형태의 돌연변이로 성공적으로 검색할 수 있었다.

<68>      상기 결과에서 보듯이, 개발된 DNA 칩을 이용한 진단에서 검색할 돌연변이는 새로운 돌연변이가 발견될 때마다 계속적으로 추가 삽입이 가능하고, 물론씩 병뿐만이 아니라 타 유전질환의 돌연변이에 대한 검색 탐침을 추가 삽입함으로써, 여러 유전 질환의 동시 진단DNA 칩의 제작이 가능함을 알 수 있었다.

<69>      실시예 10: 미지의 환자 진단에의 적용

<70>      정상인이나 환자임이 밝혀지지 않은 미지의 한국인 두 사람(환자 A, 환자 B)의 혈액 시료를 대상으로 DNA 칩을 이용하여 유전병의 여부를 진단하였다. 본 발명의 실시예 9에서 제작된 DNA 칩을 미지의 환자 진단에 적용한 결과, 환자 A의 경우 16가지 아미노산 모두에 대해서 돌연변이가 아님을 확인할 수 있었고, 환자 B의 경우에는 Arg778Leu 이질 돌연변이와 Ala874Val 이질 돌연변이를 확인



할 수 있었다. 이러한 상기 결과의 정확성을 확인하기 위해 고전적인 방법인 염기서열 분석을 수행한 결과, 환자 A는 돌연변이를 가지지 않은 정상인으로, 환자 B는 두 가지 이상의 돌연변이를 가져 월슨씨 병 환자로 진단되었다. 따라서, 본 발명의 DNA 칩으로 월슨씨 병의 유전적 돌연변이 여부를 정확히 진단할 수 있음을 확인하였다.

#### 【발명의 효과】

<71> 이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 코돈 검색 알고리즘을 사용하여 선택된 코돈 영역 전체의 돌연변이 여부를 검색할 수 있는 탐침의 제조 방법, 전기 방법으로 제조된 탐침을 이용한 DNA 칩의 제조방법, 전기 제조방법으로 제조된 DNA 칩 및 전기 DNA 칩을 이용한 돌연변이의 검색방법을 제공한다. 본 발명의 코돈 검색 알고리즘을 이용한 탐침의 제조방법은 특정 유전질환 환자에서 나타나는 변이 코돈을 선정하는 공정; 및, 선정된 변이 코돈을 7개 이상의 염기로 구성된 DNA 탐침의 중앙 근처에 위치시키고, 변이 코돈 이외의 염기는 정상인의 염기와 동일하며, 3'에 아민기가 결합되도록 탐침을 제조하는 공정을 포함하고, 본 발명의 DNA 칩의 제조방법은 전기 방법으로 제조된 탐침을 스폿팅 방법으로 고체표면에 고정하여 DNA 칩을 제조하는 공정을 포함하며, 전기 DNA 칩을 이용한 돌연변이의 검색방법은 형광물질 표지된 시료를 DNA 칩과 반응시키고, 세척한 후, DNA 칩에 잔류한 형광물질의 양을 측정하는 단계를 포함한다. 본 발명의 DNA 칩을 이용하면 이전의 알고리즘에 의한 탐침의 설계에서 나타난 부정확한 결합으로 인한 잘못된 결과의 해석 가능성을 배제할 수 있고, 이질 돌연변이



와 동질 돌연변이를 쉽게 구별할 수 있고, 다양한 유전질환의 원인이 되는 돌연변이 여부와 그 종류를 정확하고 신속히 진단할 수 있을 뿐만 아니라, 코돈 검색 알고리즘에 의해 제작된 DNA 칩을 모든 종류의 유전질환의 검사와 SNP와 같은 유전자 변이의 진단에 적용할 수 있을 것이다.



【특허청구범위】

【청구항 1】

(i) 특정 유전질환 환자에서 나타나는 변이 코돈을 선정하는 공정; 및,  
(ii) 선정된 변이 코돈을 7개 이상의 염기로 구성된 DNA 탐침의 중앙 근처에 위치시키고, 변이 코돈 이외의 염기는 정상인의 염기와 동일하며, 3'에 아민기가 결합되도록 탐침을 제조하는 공정을 포함하는, 코돈 검색 알고리즘을 이용한 탐침의 제조방법.

【청구항 2】

제 1항에 있어서,

변이 코돈의 첫 번째 염기가 각각 A, G, C, T이고, 코돈의 나머지 두 염기는 정상인의 염기서열과 동일한 4개의 탐침을 설계하고, 전기 변이 코돈의 두 번째 염기가 각각 A, G, C, T이고, 코돈의 나머지 두 염기는 정상인의 염기서열과 동일한 4개의 탐침을 설계하며, 전기 변이 코돈의 세 번째 염기가 각각 A, G, C, T이고, 코돈의 나머지 두 염기는 정상인의 염기서열과 동일한 4개의 탐침을 설계하여, 하나의 변이 코돈에 대하여 12개의 탐침을 제조하는 것을 특징으로 하는 코돈 검색 알고리즘을 이용한 탐침의 제조방법.



【청구항 3】

제 1항의 방법으로 제조된 탐침을 알데히드가 코팅된 고체표면에 스폿팅하여, 탐침을 고체표면에 고정시키는 공정을 포함하는 DNA 칩의 제조방법.

【청구항 4】

제 3항에 있어서,

고정은 탐침의 아민기와 고체표면의 알데히드의 결합반응으로  
수행되는 것을 특징으로 하는  
DNA 칩의 제조방법.

【청구항 5】

제 3항에 있어서,

결합반응은 70 내지 90%의 습도조건하에 4 내지 8시간동안 수행되는  
것을 특징으로 하는  
DNA 칩의 제조방법.

【청구항 6】

제 3항에 있어서,

고체는 유리판인 것을 특징으로 하는



DNA 칩의 제조방법.

【청구항 7】

제 3항의 방법으로 제조된 DNA 칩.

【청구항 8】

( i ) 검색할 유전자와 형광물질이 결합된 프라이머를 사용한 PCR을 수행하여, 형광물질이 결합된 검색시료를 수득하는 단계;

( ii ) 수득한 검색시료를 DNA 칩에 가하여, 10 내지 37℃에서 3 내지 13시간 동안 반응시키고, 반응시킨 DNA 칩을 세척하는 단계; 및,

(iii) 세척된 DNA 칩에 잔류한 형광물질의 양을 측정하는 단계를 포함하는, 제 8항의 DNA 칩을 이용한 돌연변이의 검색방법.

【청구항 9】

제 8항에 있어서,

검색시료와 DNA 칩의 반응은 3 내지 10X 결합완충용액(SSPE: 0.15M

NaCl, 10mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1mM EDTA, pH 7.4)에서 수행되는 것을

특징으로 하는

제 8항의 DNA 칩을 이용한 돌연변이의 검색방법.



【청구항 10】

제 8항에 있어서,

DNA 칩의 세척은 1차 세척액(0.45M NaCl, 30mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 3mM

EDTA, pH 7.4)으로 5분 동안 수행한 다음, 2차 세척액(0.3M NaCl,

20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2mM EDTA, pH 7.4)으로 5분간 수행하는 것을

특징으로 하는

제 8항의 DNA 칩을 이용한 돌연변이의 검색방법.



## 【도면】

【도 1】

|   |                |     |                |      |                |      |   |
|---|----------------|-----|----------------|------|----------------|------|---|
| C | C              | C   | C              | C    | C              | C    | C |
| C | <del>1-1</del> | 1-2 | 1-3            | 1-4  | <del>1-5</del> | 1-6  | C |
| C | 1-7            | 1-8 | <del>1-9</del> | 1-10 | 1-11           | 1-12 | C |
| C | <del>2-1</del> | 2-2 | 2-3            | 2-4  | <del>2-5</del> | 2-6  | C |
| C | 2-7            | 2-8 | <del>2-9</del> | 2-10 | 2-11           | 2-12 | C |
| C | <del>3-1</del> | 3-2 | 3-3            | 3-4  | <del>3-5</del> | 3-6  | C |
| C | 3-7            | 3-8 | <del>3-9</del> | 3-10 | 3-11           | 3-12 | C |
| C | <del>4-1</del> | 4-2 | 4-3            | 4-4  | <del>4-5</del> | 4-6  | C |
| C | C              | C   | C              | C    | C              | C    | C |

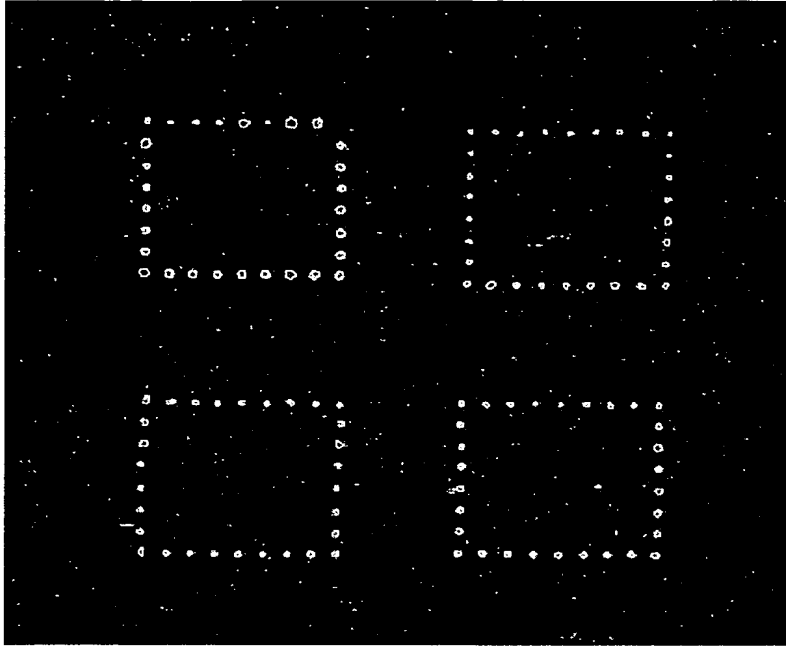
|   |                |     |                |      |                |      |   |
|---|----------------|-----|----------------|------|----------------|------|---|
| C | C              | C   | C              | C    | C              | C    | C |
| C | 4-7            | 4-8 | <del>4-9</del> | 4-10 | 4-11           | 4-12 | C |
| C | <del>5-1</del> | 5-2 | 5-3            | 5-4  | <del>5-5</del> | 5-6  | C |
| C | 5-7            | 5-8 | <del>5-9</del> | 5-10 | 5-11           | 5-12 | C |
| C | <del>6-1</del> | 6-2 | 6-3            | 6-4  | <del>6-5</del> | 6-6  | C |
| C | 6-7            | 6-8 | <del>6-9</del> | 6-10 | 6-11           | 6-12 | C |
| C | <del>7-1</del> | 7-2 | 7-3            | 7-4  | <del>7-5</del> | 7-6  | C |
| C | 7-7            | 7-8 | <del>7-9</del> | 7-10 | 7-11           | 7-12 | C |
| C | C              | C   | C              | C    | C              | C    | C |

|   |                 |      |                 |       |                 |       |   |
|---|-----------------|------|-----------------|-------|-----------------|-------|---|
| C | C               | C    | C               | C     | C               | C     | C |
| C | <del>8-1</del>  | 8-2  | 8-3             | 8-4   | <del>8-5</del>  | 8-6   | C |
| C | 8-7             | 8-8  | <del>8-9</del>  | 8-10  | 8-11            | 8-12  | C |
| C | <del>9-1</del>  | 9-2  | 9-3             | 9-4   | <del>9-5</del>  | 9-6   | C |
| C | 9-7             | 9-8  | <del>9-9</del>  | 9-10  | 9-11            | 9-12  | C |
| C | <del>10-1</del> | 10-2 | 10-3            | 10-4  | <del>10-5</del> | 10-6  | C |
| C | 10-7            | 10-8 | <del>10-9</del> | 10-10 | 10-11           | 10-12 | C |
| C | <del>11-1</del> | 11-2 | 11-3            | 11-4  | <del>11-5</del> | 11-6  | C |
| C | C               | C    | C               | C     | C               | C     | C |

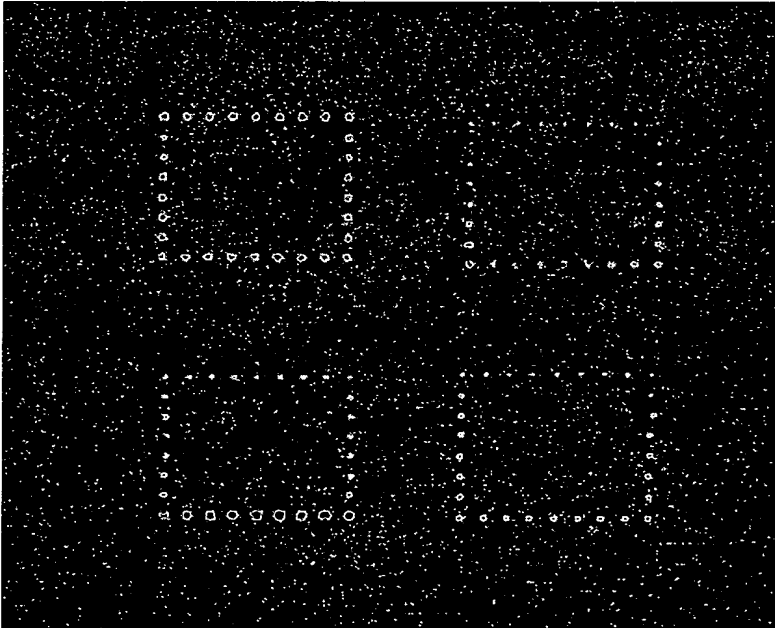
|   |                 |      |                 |       |                 |       |   |
|---|-----------------|------|-----------------|-------|-----------------|-------|---|
| C | C               | C    | C               | C     | C               | C     | C |
| C | 11-7            | 11-8 | <del>11-9</del> | 11-10 | 11-11           | 11-12 | C |
| C | <del>12-1</del> | 12-2 | 12-3            | 12-4  | <del>12-5</del> | 12-6  | C |
| C | 12-7            | 12-8 | <del>12-9</del> | 12-10 | 12-11           | 12-12 | C |
| C | <del>13-1</del> | 13-2 | 13-3            | 13-4  | <del>13-5</del> | 13-6  | C |
| C | 13-7            | 13-8 | <del>13-9</del> | 13-10 | 13-11           | 13-12 | C |
| C | <del>14-1</del> | 14-2 | 14-3            | 14-4  | <del>14-5</del> | 14-6  | C |
| C | 14-7            | 14-8 | <del>14-9</del> | 14-10 | 14-11           | 14-12 | C |
| C | C               | C    | C               | C     | C               | C     | C |



【도 2a】

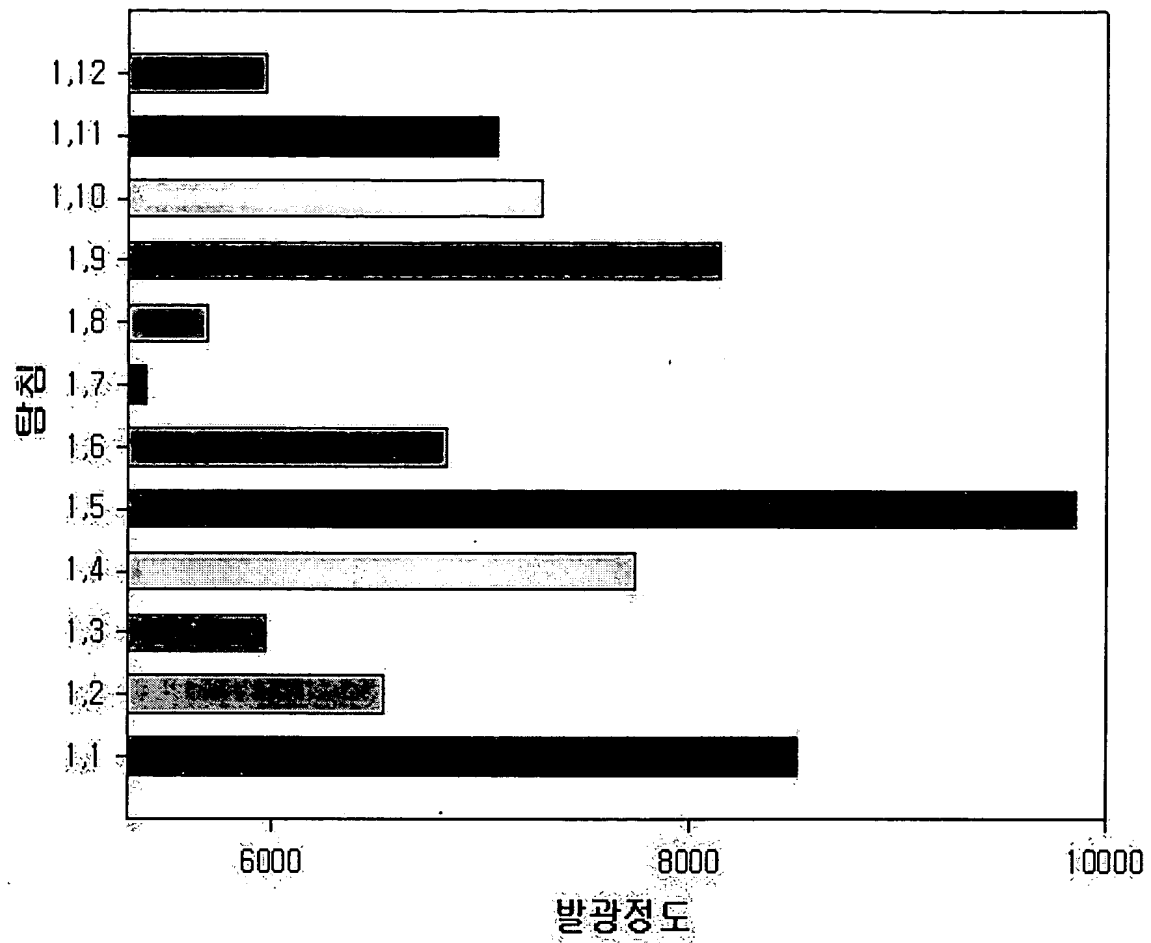


【도 2b】



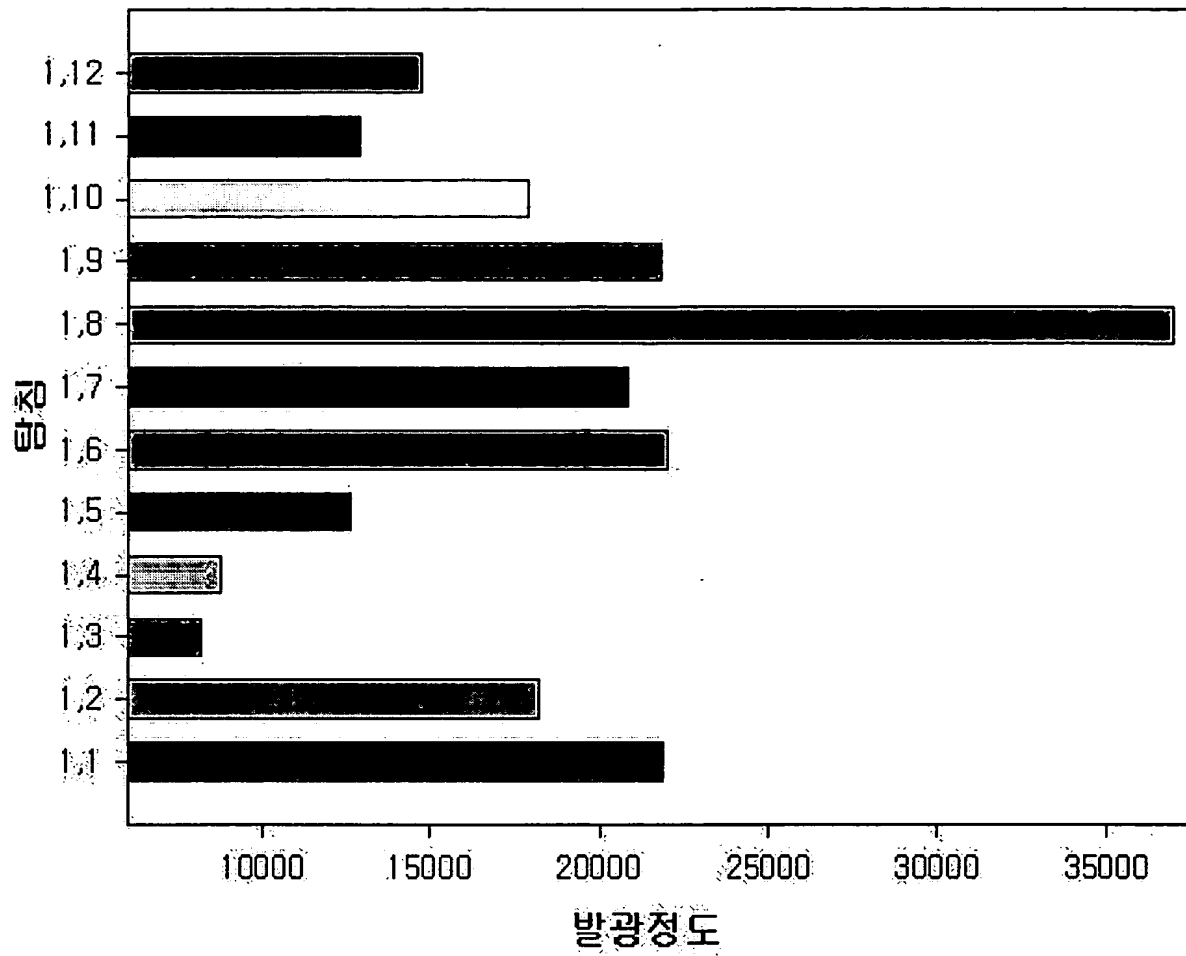


【도 3a】



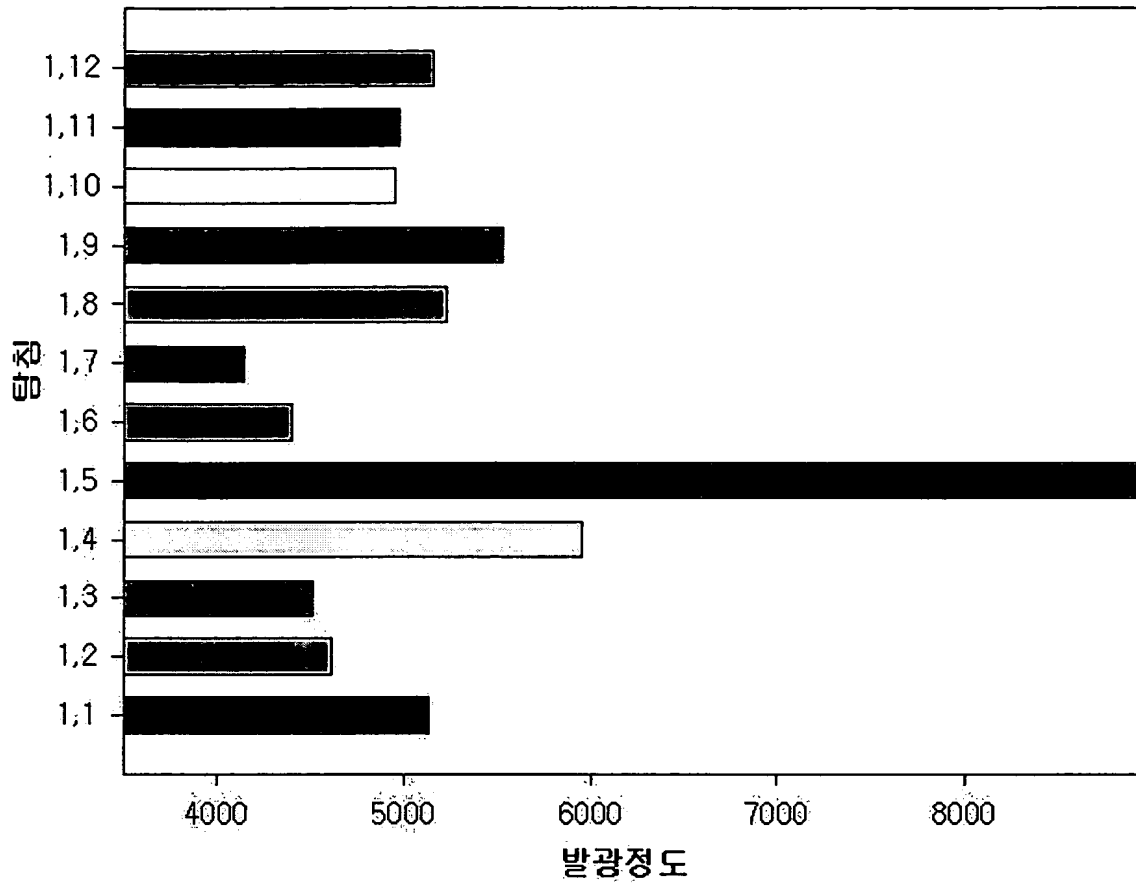


【도 3b】



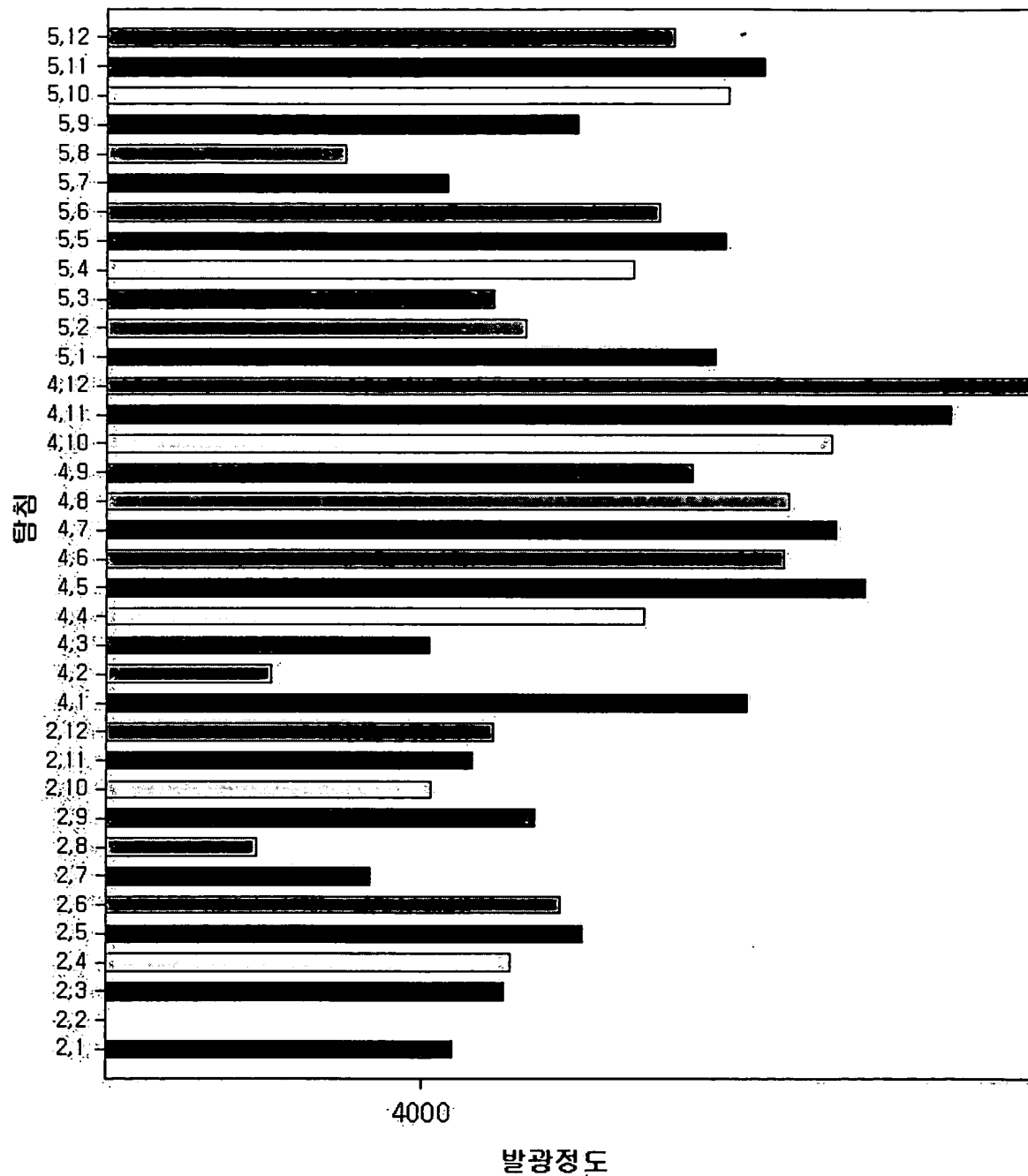


【도 4a】





【도 4b】



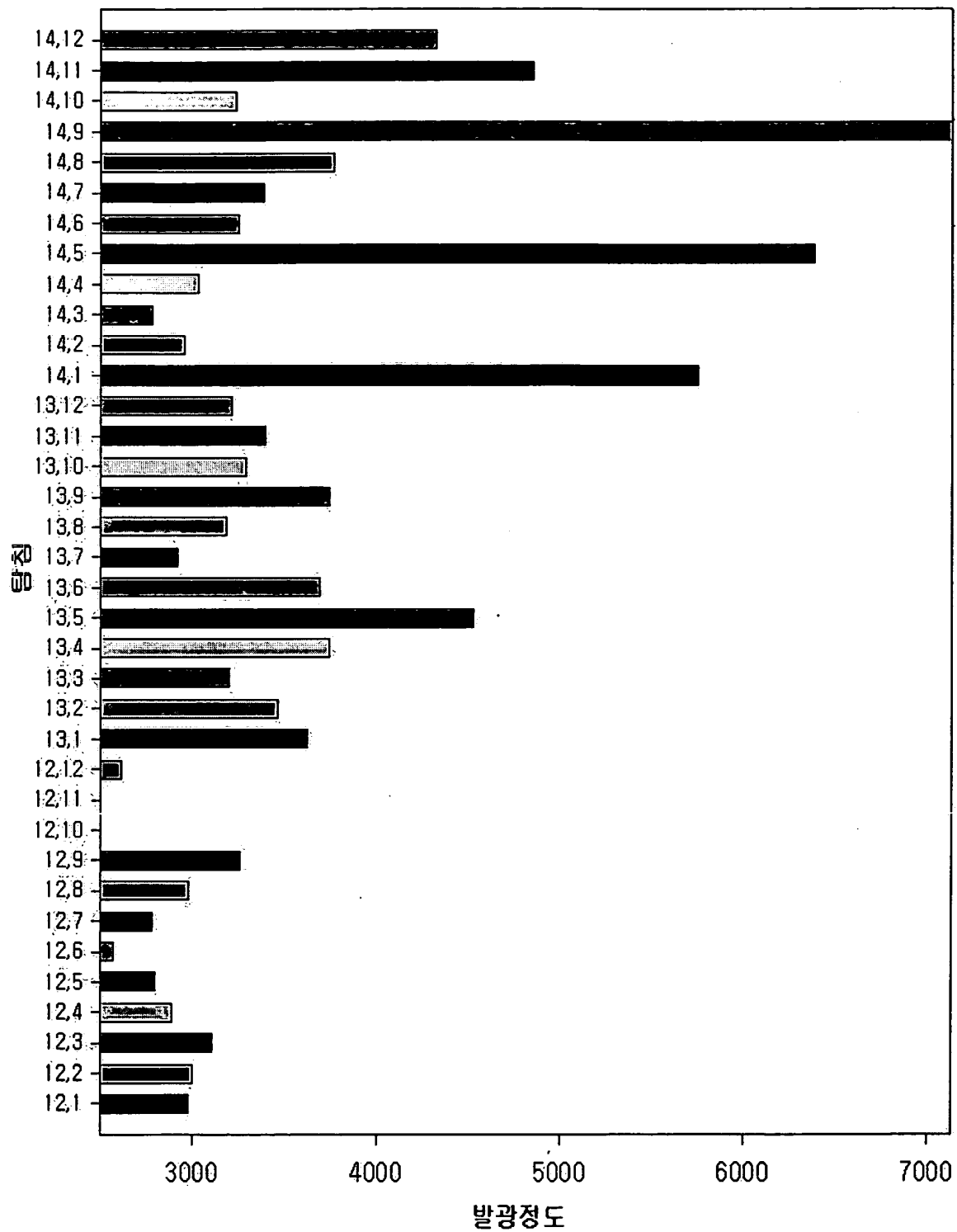


【도 4c】



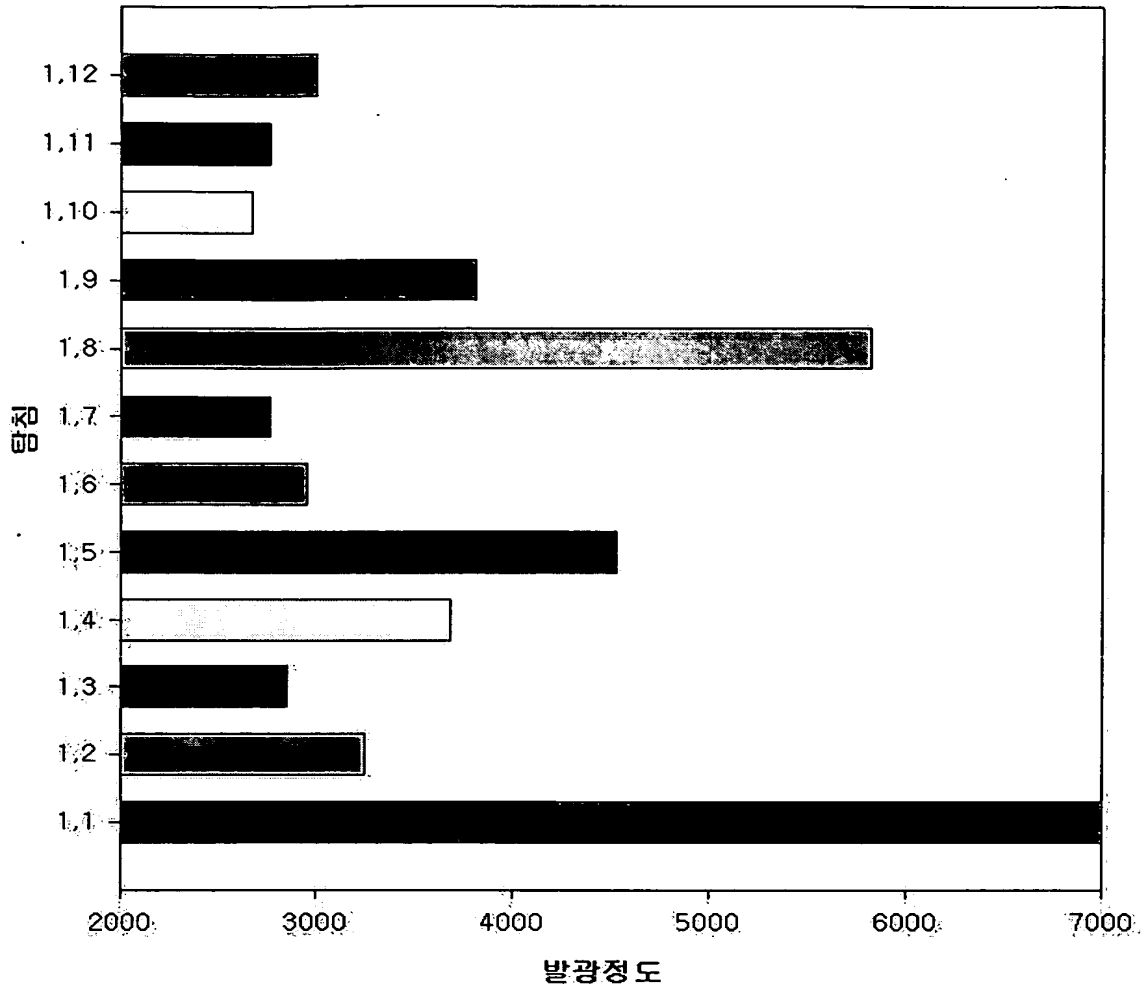


【도 4d】



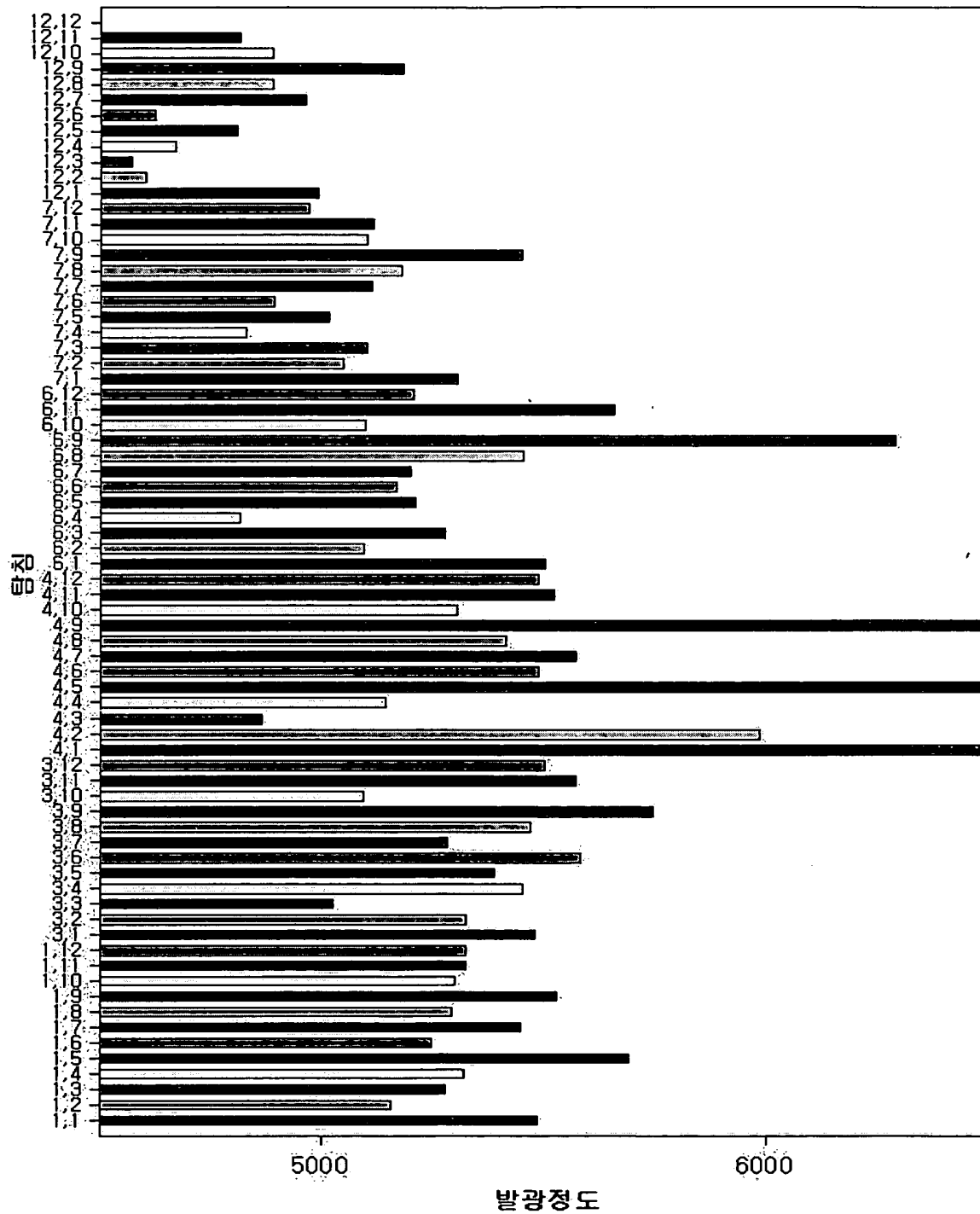


【도 5】



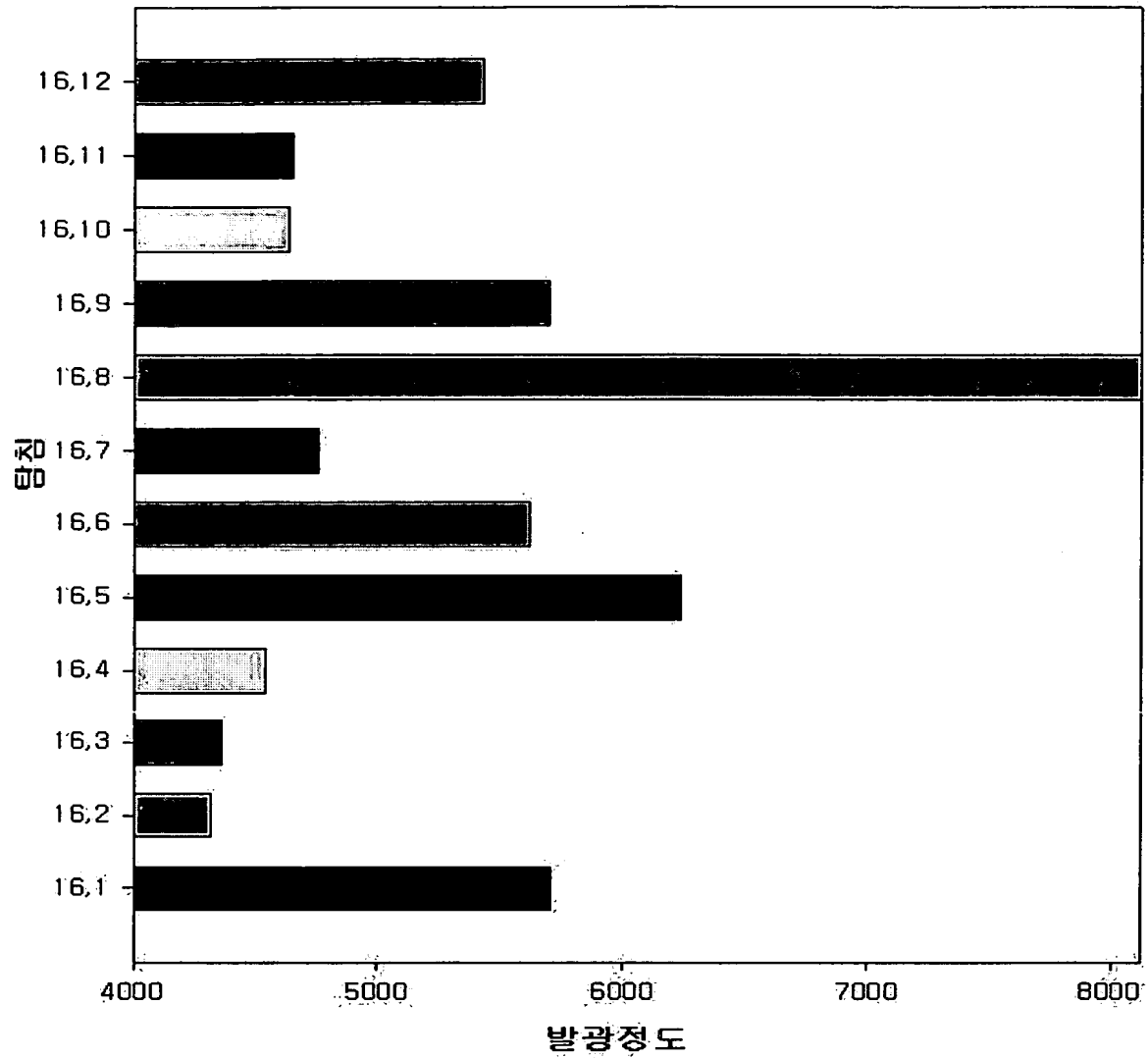


【도 6】



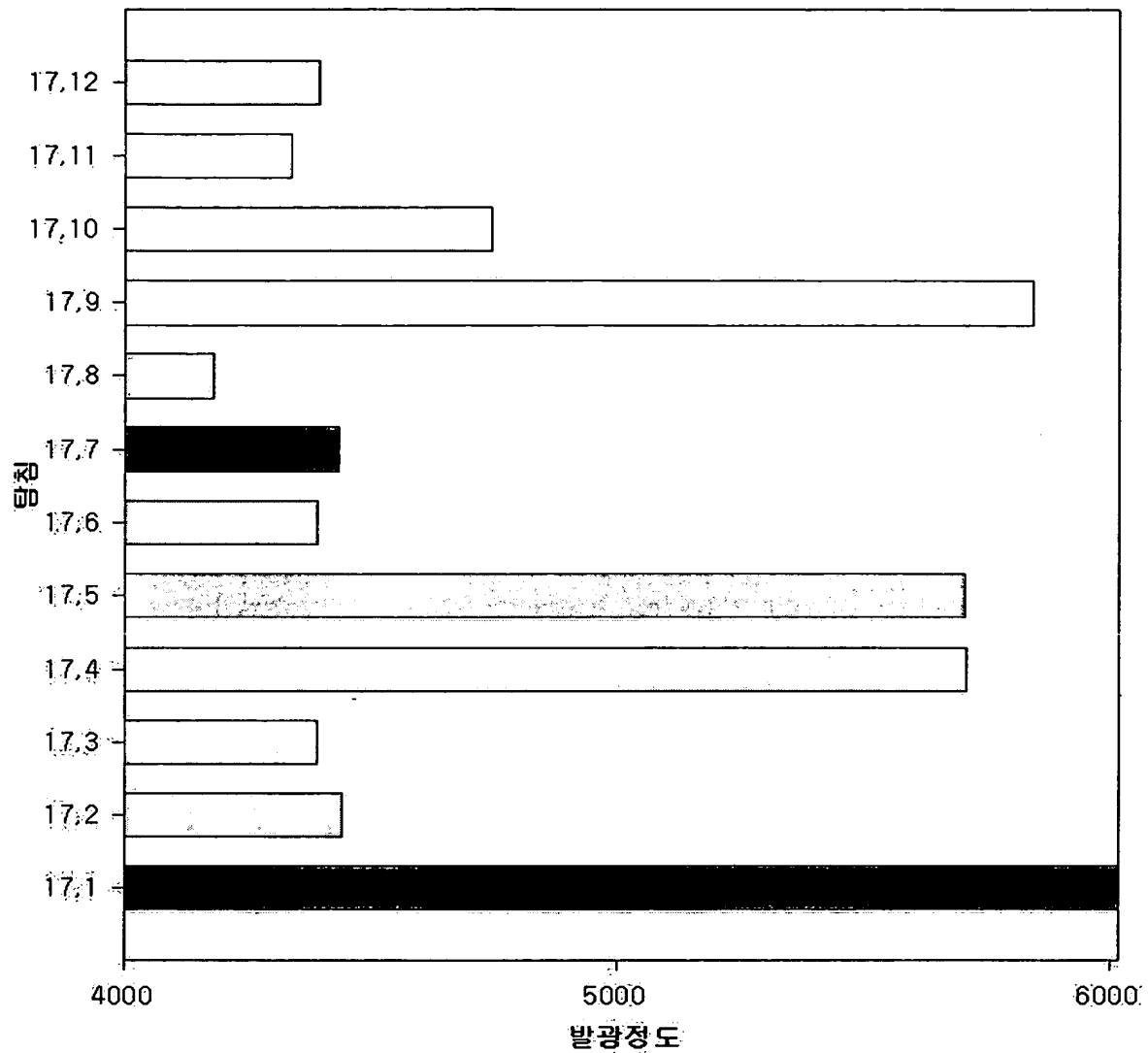


【도 7a】





【도 7b】



## 【서열목록】

<11> Korea Advanced Institute of Science and Technology <12>

DNA Chip Using Codon Scanning Algorithm <16> 14 <17>



KOPATIN 1.5 &lt;210&gt; 1 &lt;211&gt; 19 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt;  
 Artificial Sequence &lt;220&gt; &lt;223&gt; primer 1 &lt;400&gt; 1  
 gccctgtgac attcttcga 19  
 &lt;210&gt; 2 &lt;211&gt; 19 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt;  
 Artificial Sequence &lt;220&gt; &lt;223&gt; primer 2 &lt;400&gt; 2  
 gctgctgtta cctttgccca 19  
 &lt;210&gt; 3 &lt;211&gt; 20 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt;  
 Artificial Sequence &lt;220&gt; &lt;223&gt; primer 3 &lt;400&gt; 3  
 gatgtttgac aagactggca 20  
 &lt;210&gt; 4 &lt;211&gt; 21 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt;  
 Artificial Sequence &lt;220&gt; &lt;223&gt; primer 4 &lt;400&gt; 4  
 cctctttaca gtatttggtg a 21  
 &lt;210&gt; 5 &lt;211&gt; 19 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt;  
 Artificial Sequence &lt;220&gt; &lt;223&gt; primer 5 &lt;400&gt; 5  
 caatcgca ga cgctgtcaa 19  
 &lt;210&gt; 6 &lt;211&gt; 19 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt;  
 Artificial Sequence &lt;220&gt; &lt;223&gt; primer 6 &lt;400&gt; 6  
 ctgtacctgg gtggcaata 19  
 &lt;210&gt; 7 &lt;211&gt; 20 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt;  
 Artificial Sequence &lt;220&gt; &lt;223&gt; primer 7 &lt;400&gt; 7  
 taaagggaag aaagtcgcca 20



<210> 8 <211> 18 <212> DNA <213>  
 Artificial Sequence <220> <223> primer 8 <400> 8  
 gctgcctcga tggccaca 18  
 <210> 9 <211> 16 <212> DNA <213>  
 Artificial Sequence <220> <223> reporter gene <400> 9  
 cagccaccgg cccagg 16  
 <210> 10 <211> 17 <212> DNA <213>  
 Artificial Sequence <220> <223> reporter gene <400>  
 10 ccagccacag gccagg 17  
 <210> 11 <211> 19 <212> DNA <213>  
 Artificial Sequence <220> <223> primer 9 <400> 11  
 ctacgtctag gagaagcca 19  
 <210> 12 <211> 19 <212> DNA <213>  
 Artificial Sequence <220> <223> primer 10 <400> 12  
 gagcacagag ccatgtgca 19  
 <210> 13 <211> 18 <212> DNA <213>  
 Artificial Sequence <220> <223> primer 11 <400> 13  
 ctttcacttc acccctct 18  
 <210> 14 <211> 18 <212> DNA <213>  
 Artificial Sequence <220> <223> primer 12 <400> 14  
 tgcctggaag tccgtgca 18